

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

17.09.99

4

REC'D 05 NOV 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されてPCT  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 9月17日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第263004号

出 願 人

Applicant (s):

雪印乳業株式会社

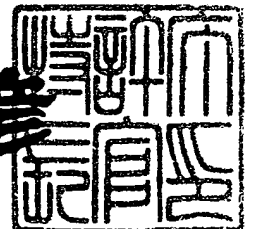
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



【書類名】 特許願

【整理番号】 YTP98014

【提出日】 平成10年 9月17日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【発明の名称】 肥満予防及び／又は治療剤

【請求項の数】 1

【発明者】

    【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町下古山4 5 6-1

    【氏名】 後藤 雅昭

【発明者】

    【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大松山1-3-3 SKマンション3-E

    【氏名】 友保 昌拓

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガーデン東大宮1-524

    【氏名】 山口 京二

【発明者】

    【住所又は居所】 栃木県河内郡上三川町ゆうきが丘53-8

    【氏名】 木野崎 雅彦

【発明者】

    【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ2-4

    【氏名】 中川 信明

【特許出願人】

    【識別番号】 000006699

    【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

    【代表者】 石川 哲郎

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 030166

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肥満予防及び／又は治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スタンニオカルシン (Stanniocalcin) を有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、スタンニオカルシンを有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤に関する。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

【0002】

【従来の技術】

肥満は、糖尿病、高血圧症、心臓病などのリスクファクターであり、先進国の国民の健康を脅かす存在である。肥満とは、脂肪組織が普通以上に蓄積した身体状況のことを言う。脂肪組織は、生体内の余剰エネルギーを脂肪、即ちトリグリセライドとして備蓄している特殊な器官であり、脂肪細胞、その前駆細胞を含む線維芽細胞、マクロファージ、血管周囲細胞、血液細胞などから構成されている。脂肪細胞は、脂肪組織に存在する細胞の1/3から2/3を占めると言われており、その細胞内に脂肪、即ちトリグリセライドを蓄積している。脂肪細胞は、間葉系の多能性幹細胞から、脂肪細胞としての素地を獲得した脂肪芽細胞、脂肪滴は出現していないが脂肪細胞の初期マーカーを有する前駆脂肪細胞、脂肪滴を有する未成熟脂肪細胞、脂肪が多量に蓄積した成熟脂肪細胞へと分化・成熟していくとされている。軽度の肥満成人の生体内では、個々の脂肪細胞が蓄積している脂肪、即ちトリグリセライド量が増加し細胞が肥大化している。肥満の程度が大きくなると脂肪細胞の数も増加する。従って、脂肪細胞への分化・成熟を抑制し脂肪細胞の数を減少させることや、成熟脂肪細胞の肥大化を抑制することにより、蓄積脂肪量の増加を抑制し肥満の進行を止め、肥満を治療することが期待される。生体内における脂肪細胞の分化制御は、食物摂取や運動などの環境因子な

どから派生する数多くの因子によって、正あるいは負に行われていることが明らかにされてきた。前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を抑制するサイトカインとして、腫瘍壊死因子- $\alpha$  ; (TNF- $\alpha$  : Torti F.M. et al., Science, Vol.229, p867 (1985))、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Ignatz R.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p8530 (1985))、プレアディポサイトファクター-1 (Pref-1, Preadipocyte factor-1 : Smas C.M. et al., Cell, Vol.73, p725 (1993))などのサイトカインが報告されている。又、近年クローニングされた ob 遺伝子の翻訳蛋白質レプチンは、おそらくは中枢神経を介して摂食量や脂肪組織重量を減少させることが報告されている (Levin N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93. p1726, 1996)。さらには、強力な摂食促進作用を有する脳内ペプチド・ニューロペプチド Y とそのレセプターも肥満を抑制する医薬品開発の強力なツールとして注目されている (Sainsburg A. et al. Diabetologia, Vol. 39, p353, 1996)。これらのサイトカインは、脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用による肥満の治療剤となることが期待され、レプチンなど上記のサイトカインの一部については、肥満の治療剤又は予防薬として臨床試験が進められている。

また現在、肥満の治療薬又は予防薬として、米国では既にレダックス (アメリカンホームプロダクツ社) が上市されている。又、メリディア (クノール社) やキセニカル (ロッシュ社) など、米国において肥満の治療薬又は脂肪の吸収抑制薬として認可される見通しである。しかし、これらの薬剤を用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わるより有効性が高く副作用の少ない新しい治療薬の開発が望まれていた。

### 【0003】

#### 【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、上述の状況に鑑み抗肥満作用あるいは肥満の改善作用を有する物質を求め鋭意探索の結果、ミネラル代謝を調節する蛋白質として知られているスタンニオカルシン (Stanniocalcin ; STC : Olsen H.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1972 (1996)) が、脂肪細胞形成抑制活性、即ち脂肪細胞の分化及び又は成熟を抑制する活性を有することを見い出すに至った。

従って本発明は、スタンニオカルシンを有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明は、スタンニオカルシンを有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤に関する。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、Olsen H.S.らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1972 (1996)) により得ることができる。具体的には、上述の文献あるいはジーンバンク等を検索することにより、スタンニオカルシンの cDNA 配列を知ることができ、その配列情報に基づいて、PCR法等を用いてスタンニオカルシンの cDNA を得ることができる。得られた cDNA を挿入した発現ベクターを動物細胞等にトランスフェクトして、スタンニオカルシン発現細胞を得ることができる。得られたスタンニオカルシン発現細胞を培養した培養液から常法により精製することにより、スタンニオカルシンを得ることができる。

【0006】

脂肪細胞形成抑制活性は、Kodama H. らの方法 (Journal of Cellular Physiology, Vol.112, p83 (1982))、即ち、マウス前駆脂肪細胞株を標的細胞として用い、デキサメタゾン存在下での脂肪細胞形成の抑制を、トリグリセライドの蓄積抑制で評価することにより確認できる。

【0007】

本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、肥満の予防及び／又は治療を目的とした医薬組成物として、ヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。スタンニオカルシンは、製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。これらの製剤は、公知の製剤学的

製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、安定剤、着色剤、界面活性剤、その他添加剤などを用いることにより、目的とする製剤とすることができる。注射用組成物の場合は、本発明の有効成分であるスタンニオカルシンの薬理学的有効量及び製剤学的に許容し得る賦形剤／賦活剤との混合物とし、その中にアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物などの一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いても良い。必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法によって各種注射剤とすることができる。

【0008】

【実施例】

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、これらによって本発明は何ら限定されるものではない。

【0009】

【実施例1】

スタンニオカルシンの製造

i) IMR-90細胞からのポリ(A)<sup>+</sup> RNA の単離

ファストトラックmRNAアイソレーションキット (Invitrogen社) を用い、そのマニュアルに従って  $1 \times 10^8$  個のIMR-90細胞より約  $10 \mu\text{g}$  のポリ(A)<sup>+</sup> RNA を単離した。

【0010】

ii) ヒトスタンニオカルシン発現ベクターの構築

単離したポリ(A)<sup>+</sup> RNA、 $1 \mu\text{g}$  を鋳型としてスーパースクリプトII cDNA 合成キット (ギブコBRL社) を用いて、同社のプロトコールに従って一本鎖cDNAを合成し、このcDNAとプライマーSTCF1N (配列表配列番号1) 及びプライマーSTCR1Xh (配列表配列番号2) を用いて、PCRを行い、STC cDNA断片を取得した。以下にPCRの条件を示す。

|                        |    |               |
|------------------------|----|---------------|
| 10X Ex Taqバッファー (宝酒造社) | 10 | $\mu\text{l}$ |
| 2.5 mM dNTP            | 8  | $\mu\text{l}$ |
| cDNA溶液                 | 1  | $\mu\text{l}$ |

|                           |      |         |
|---------------------------|------|---------|
| Ex Taq (宝酒造社)             | 0.5  | $\mu$ l |
| 蒸留水                       | 74.5 | $\mu$ l |
| 20 $\mu$ M プライマー-STCF1N   | 5    | $\mu$ l |
| 100 $\mu$ M プライマー-STCR1Xh | 1    | $\mu$ l |

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95℃で3分前処理後、95℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間の3段階の反応を30回繰り返した後、70℃で5分間保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約900bpの均一なDNA断片が得られたことを確認した。この断片を常法によりシーケンスし、スタンニオカルシンをコードするcDNAが得られたことを確認した。cDNA配列を配列表配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号4にそれぞれ示す。

得られた約900bpのDNA断片を、QIAEXII DNA extraction kit (QIAGEN社) によって精製した。このDNA断片を制限酵素XhoIおよびNheI (宝酒造社) で切断し、QIAEXII DNA extraction kitにより精製した (STC XhoI-NheI 断片)。STC XhoI-NheI 断片をXhoIおよびNheIで切断した pCEP4 (Invitrogen社) に、ligation kit ver.2 (宝酒造社) により結合させてpCEPSTCを得た。このプラスミドは、スタンニオカルシンをコードするDNAを含んでいる。このプラスミドを含む大腸菌 (DH5 $\alpha$ ; ギブコBRL社) は、DH5 $\alpha$ /pCEP-STC として平成10年8月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-16933として寄託されている。尚、PCR由来のDNA部分に、DNA合成時における塩基の誤った取り込みがない事を、DNAシーケンシングにより確認した。

【0011】

### iii) ヒトスタンニオカルシンの発現

実施例1-ii) で得られたpCEPSTCを持つ大腸菌DH5 $\alpha$ を、50  $\mu$ g/mlのアンピシリン (シグマ社) および4.7%のグリセロールを含むTeriffic Broth (ライフテクノロジーズ社) 2ml中で37℃一晩振盪培養し、菌体からプラスミドDNAをQIAWELL kit (QIAGEN社) により精製した。293-EBNA細胞 (Invitrogen社) を10%牛胎児血清を含むIMDM (ライフテクノロジーズ社) 中  $2 \times 10^5$  /ウェル/ml



となるように24ウェルプレートの各ウェルに播種し、37℃一晚、CO<sub>2</sub> インキュベーター（5% CO<sub>2</sub>）中で培養した。pCEPSTC あるいはpCEP4 をFugene6（ベールンガーマンハイム社）を用いて、293-EBNA細胞にトランスフェクトした。DNAは各0.5  $\mu$ g、Fugene6 は1  $\mu$ l 用いた。トランスフェクション後、37℃で3日間CO<sub>2</sub> インキュベーター（5% CO<sub>2</sub>）中で培養した。得られた培養液の脂肪細胞形成抑制活性を、以下の方法により測定した。

【0012】

#### iv) 脂肪細胞形成抑制活性の測定

脂肪細胞形成抑制活性測定は、Kodama H. らの方法（Journal of Cellular Physiology, Vol.112, p83 (1982)）に従い、以下の方法により行った。即ち、マウス前駆脂肪細胞株MC3T3-G2/PA6細胞（RIKEN GENE BANK, RCB1127）を標的細胞として用い、デキサメタゾン存在下での脂肪細胞の形成をトリグリセライドの蓄積を指標として試験し、その抑制活性を測定した。96ウェルマイクロプレートに10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM（ギブコBRL社）で希釈したサンプル（実施例1-iii）で得られた培養液、ベクターのみを導入した細胞の培養液、及び293-EBNA細胞のみの培養液）50  $\mu$ l を入れ、マウス前駆脂肪細胞株MC3T3-G2/PA6細胞 $3 \times 10^3$  個を50  $\mu$ l の $2 \times 10^{-7}$  Mデキサメタゾン及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEMに懸濁させて播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて一週間培養した。培養7日後に培地を吸引除去し、風乾後、脂肪細胞中に蓄積したトリグリセライドをトリグリセライド測定キット（トリグリセライドG-テストワコー、コード番号274-69802、和光純薬工業社）を用いて測定した。この時、OD510nm の減少を脂肪細胞形成抑制活性として評価した。結果を表1に示す。この結果、得られた培養液中のスタンニオカルシンが、脂肪細胞形成抑制活性を有することが確認された。

【0013】

【表1】

| 希釈率           | 1/4   | 1/8   | 1/16  | 1/32  |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| STC遺伝子導入細胞培養液 | 0.061 | 0.060 | 0.057 | 0.054 |
| ベクター導入細胞培養液   | 0.036 | 0.021 | 0.009 | 0.007 |
| 293-EBNA細胞培養液 | 0.032 | 0.017 | 0.014 | 0.011 |

【0014】

## 【実施例2】

3T3/LI細胞を用いた脂肪細胞形成抑制活性の測定

マウス前駆脂肪細胞株3T3-LI細胞（ATCC寄託—受託番号CL173）を標的細胞として用い、デキサメタゾンと1-メチル-3-イソブチルキサンチン存在下での脂肪細胞の形成をトリグリセライドの蓄積を指標として試験し、その抑制活性を測定することによって、脂肪細胞形成抑制活性を評価した。即ち、96ウェルマイクロプレートに10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM（ギブコBRL社）で希釈した実施例1と同様のサンプル50 $\mu$ lを入れ、マウス前駆脂肪細胞株3T3-LI細胞 $5 \times 10^3$ 個を50 $\mu$ lの $4 \times 10^{-7}$ Mデキサメタゾン、 $2 \times 10^{-5}$ M 1-メチル-3-イソブチルキサンチン及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEMに懸濁させて播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃、湿度100%にて一週間培養した。培養7日後に培地を吸引除去し、風乾後、脂肪細胞中に蓄積したトリグリセライドをトリグリセライド測定キット（トリグリセライドG-テストワコー、コード番号274-69802、和光純薬工業社）を用いて測定した。この時、OD510nmの減少を脂肪細胞形成抑制活性として評価した。結果を表2に示す。この結果、3T3-LI細胞を標的細胞として用いた場合にも、実施例1と同様に、培養液中のスタンニオカルシンが、脂肪細胞形成抑制活性を有することが確認された。

【0015】

【表2】

| 希釈率           | 1/4   | 1/8   | 1/16  | 1/32  |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| STC遺伝子導入細胞培養液 | 0.081 | 0.083 | 0.082 | 0.083 |
| ベクター導入細胞培養液   | 0.026 | 0.017 | 0.012 | 0.011 |
| 293-EBNA細胞培養液 | 0.021 | 0.004 | 0.006 | 0.016 |

【0016】

【発明の効果】

本発明により、スタンニオカルシンを有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤が提供される。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

【0017】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 雪印乳業株式会社 Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

<120> 肥満予防及び／又は治療剤

<130> YTP98014

<160> 4

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 1

GGGGCTAGCC AACAACTTAG CGGAAACTT

29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 2

CCCCTCGAGT GTGTCAACAC CCCTAAAAT

29

<210> 3

<211> 741

<212> DNA

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<308> GenBank, U46768

<309> 1996-02-22

<400> 3

atgctccaaa actcagcagt gcttctggtg ctggtgatca gtgcttctgc aacccatgag 60  
gcggagcaga atgactctgt gagccccagg aaatcccagag tggcggccca aaactcagct 120  
gaagtgggttc gtigccctcaa cagtgtctta caggctcggct gcggggcttt tgcatgcctg 180  
gaaaactcca cctgtgacac agatgggatg tatgacatct gttaaactctt cttgtacagc 240  
gctgctaaat ttgacactca gggaaaagca ttcgtcaaag agagcttaaa atgcatcgcc 300  
aacggggtca cctccaaggt cttcctcgcc attcggagggt gctccacttt ccaaaggatg 360

attgctgagg tgcaggaaga gtgctacagc aagctgaatg tgtgcagcat cgccaagcgg 420  
 aaccctgaag ccatcactga ggtcgtccag ctgcccaatc acttctccaa cagatactat 480  
 aacagacttg tccgaagcct gctggaatgt gatgaagaca cagtcagcac aatcagagac 540  
 agcctgatgg agaaaatigg gcctaacatg gccagcctct tccacatcct gcagacagac 600  
 cactgtgccc aaacacaccc acgagctgac ttcaacagga gacgcaccaa tgagccgcag 660  
 aagctgaaag tcctcctcag gaacctccga ggtgaggagg actctccctc ccacatcaaa 720  
 cgcacatccc atgagagtgc a 741

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<400> 4

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser

5

10

15

Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser

20

25

30

Arg Val Ala Ala Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 35  | 40  | 45  |
| Ala Leu Gln Val Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr |     |     |
| 50  | 55  | 60  |
| Cys Asp Thr Asp Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser |     |     |
| 65  | 70  | 75  |
| Ala Ala Lys Phe Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu |     |     |
| 85  | 90  | 95  |
| Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg |     |     |
| 100   | 105 | 110 |
| Arg Cys Ser Thr Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys |     |     |
| 115   | 120 | 125 |
| Tyr Ser Lys Leu Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala |     |     |
| 130   | 135 | 140 |
| Ile Thr Glu Val Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
| Asn Arg Leu Val Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| Thr Ile Arg Asp Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| Leu Phe His Ile Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Ala Asp Phe Asn Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Leu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| Arg Thr Ser His Glu Ser Ala                                     |     | 240 |
| 245   |     |     |

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肥満予防及び／又は治療剤の提供。

【解決手段】 スタンニオカルシンを有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤。

【効果】 優れた脂肪細胞分化、成熟抑制活性を有し、医薬として有用。

【選択図】 なし



【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000006699

【住所又は居所】

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

【氏名又は名称】

雪印乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号  
氏 名 雪印乳業株式会社